

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-66596

(43) 公開日 平成10年(1998) 3月10日

(51) Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/68		7823-4B	C 1 2 Q 1/68	
// C 0 7 C 229/06		9734-4H	C 0 7 C 229/06	
C 0 9 K 3/00			C 0 9 K 3/00	R

審査請求 未請求 請求項の数13 O L (全 10 頁)

(21) 出願番号 特願平9-133370

(22) 出願日 平成9年(1997) 5月23日

(31) 優先権主張番号 9 6 1 0 8 2 7 8. 1

(32) 優先日 1996年5月23日

(33) 優先権主張国 ドイツ (D E)

(71) 出願人 597071777

メティン コルバン

ドイツ連邦共和国 エッセン ウーランド

ストラーセ 5

(72) 発明者 マイヤー エルマー

ドイツ連邦共和国 ベルリン-ダーレム

リーヒハルド ストラーセ 61

(72) 発明者 イファノフ イゴール

ドイツ連邦共和国 ベルリン エゲルスト

ラーセ 8

(74) 代理人 弁理士 吉田 研二 (外2名)

(54) 【発明の名称】 浸透物質の使用

(57) 【要約】

【課題】 シリコンなどの非活性表面に対する生物分子の望ましくない相互作用を低減または阻害するシステムを開発する。

【解決手段】 シリコン粒子存在下 P C R 反応が阻害されることが示されていたが、本発明は、このようなシリコンなどの非活性表面に対する生物分子の非共有相互作用を低減または阻害するための浸透物質の使用に関する。浸透物質としては、両性イオン浸透物質、グリシンベタインなどを利用することができる。

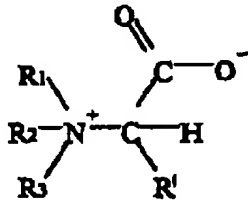
## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 非活性表面に対する生物分子の非共有結合による相互作用を削減または破壊するための浸透物質の使用。

【請求項2】 前記浸透物質が両性イオン浸透物質である請求項1に記載の浸透物質の使用。

【請求項3】 前記両性イオン浸透物質が以下の構造からなる請求項2に記載の浸透物質の使用。

## 【化1】



R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>およびR<sub>3</sub>はH(水素), CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>またはその他任意のアルキルであり、R'は任意のアミノ酸残基である。

【請求項4】 前記両性イオン浸透物質がアミノ酸またはアミノ酸のメチル化産物である請求項3に記載の浸透物質の使用。

【請求項5】 前記両性イオン浸透物質がグリシンベタインまたはその他のベタインである請求項3に記載の浸透物質の使用。

【請求項6】 前記浸透物質が最終濃度として1から2.5Mの濃度で存在する請求項1～5のいずれかに記載の浸透物質の使用。

【請求項7】 前記生物分子が巨大分子である請求項1～6のいずれかに記載の浸透物質の使用。

【請求項8】 巨大分子が炭水化物、ポリ核酸、ポリペプチド、これらの組み合わせ、またはこれらの修飾物である請求項1～6のいずれかに記載の浸透物質の使用。

【請求項9】 生物分子がペプチド、オリゴヌクレオチド、これらの組み合わせ、またはこれらの修飾物である請求項1～6のいずれかに記載の浸透物質の使用。

【請求項10】 前記ポリ核酸及び前記オリゴヌクレオチドがDNAである請求項8又は9に記載の浸透物質の使用。

【請求項11】 前記ポリ核酸及び前記オリゴヌクレオチドがRNAである請求項8又は9に記載の浸透物質の使用。

【請求項12】 非活性表面がシリコン表面、シリコンウェーハ、ガラス表面、これらの組み合わせまたはこれらの化学修飾物である請求項1～11のいずれかに記載の浸透物質の使用。

【請求項13】 上記請求項1～12のいずれかに記載された浸透物質の濃縮保存溶液と、  
上記請求項1～12のいずれかに記載された浸透物質を含有する反応緩衝液調整物質と、  
上記請求項1～12のいずれかに記載された浸透物質を

含有した酵素調整物質と、を少なくとも含むキット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、非活性表面に対する生物分子の非共有結合相互作用(non-covalent interactions)を低減または阻害するための浸透物質の使用法に関する。さらに、本発明は、本発明による使用法に用いることのできるキットに関する。

## 【0002】

10 【従来の技術】新物質の開発は、現代技術の幅広い分野において大きな影響を与えている。例えば、過去の例としては、シリコン、ガリウム亜ヒ酸塩、または多結晶物質などの導入は半導体技術に根強く浸透した。現代生物学においても、同様の開発が認められている。すなわち、過去20年にわたり、ELISAなどの免疫計量(immunometric)法において、実験プロトコルの基準化及び実験結果における物質に基づく誤差率の最小化を実現する物質が確立された。また、これと同様に重要な別の開発としては、対象となる生物学的化合物を純化及び  
20 分離するために(カラム)クロマトグラフィーにおいて用いられる新規の担体物質の促進がある。

【0003】多くの生物学的な分析及び分離技術において科学者が直面する主な問題の一つとして、実験の精度及び生産収量が、背景問題または望ましくない可能性のある不特定相互作用の問題によって損なわれるという問題がある。かかる問題は、例えば、担体表面に対するタンパク質または他の生物学的な化合物の非共有結合により発生しうる。ELISA技術においてかかる問題を解決するためには、問題の化合物をテストする前に、ポリ  
30 スチロール(polystyrol)などの担体物質の自由結合サイトを異種構造タンパク質などの関連のない生物物質に対して「遮断」する。

【0004】最も最近において革命的な分子生物学の技術は、PCR技術である。当然ながら、PCRの幅広い適用性に鑑み、この技術の様々な側面をさらに改良すべく多大な努力が現在までも、また現在でも行われている。これらの開発の一つとして、微少化されたPCRチップ、すなわち、PCR反応チャンバを形成するために平坦なガラス片に結合された微少化生成シリコンチップの開発がある(例えば、Shoffner et al., "Chip PCR. I. Surface passivation of microfabricated silicon-glass chips for PCR", Nucl. Acids Res. 24(1996), 375-379参照のこと)。これまでPCRチップの製造に用いられてきた天然シリコンがPCRの阻害剤であることが判明した。そのために研究者たちはかかる阻害剤または背景問題によって損なわれることのない信頼できるPCRの結果を得るための物質及び方法を調査し、その結果、この目標達成のために酸化シリコン(SiO<sub>2</sub>)の使用を提案した。

50 【0005】このような功績を認めた上で、さらに、一

一般的に商業上の利用が可能な表面を修正せずに、あるいは適当な非活性表面のわずかな部分の使用のみに限定することなく、非活性表面と生物分子の不特定あるいは非共有相互作用を低減または削除する方法があれば、非常に望ましく効果的である。このような手段の開発が成功すれば、その使用はPCR技術に限定されることなく現代生物学において幅広く適用できる。例えば、Volkmuth及びAustinにより、DNA分子のmicro-electrophoresis (微量電気泳動法) が開発された (Volkmuth and Austin, "DNA electrophoresis in micro lithographic arrays", Nature 358(1992), 600-602) 参照のこと)。このような技術は、ベタインなどの浸透物質を緩衝システムに含むという点からも効果がある。

#### 【0006】

【発明が解決しようとする課題】 このように、本発明の技術的課題は、上述の従来技術に関する問題を解決し、非活性表面に対する生物分子の望ましくない相互作用を低減または阻害するシステムを開発することである。

#### 【0007】

【課題を解決するための手段】 上記目的を達成するために、本発明は、非活性表面に対する生物分子の非共有相互作用を低減または阻害するための浸透物質の使用法を提供する。本発明によれば、適当な濃度の浸透物質を、生物分子を含む溶液に加えることにより、前記表面に対する前記分子の非共有結合相互作用が阻害されないまでも低減されるという驚くべき効果が得られる。

【0008】 浸透物質 (または浸透溶質) は、水による応力を与えられた (water-stressed) 多種の原核生物及び真核生物有機体から得られる。ハロバクテリアを除くこれらすべての有機体において見られる浸透物質システムの3つの種類は、多価アルコール (グリセロール及びサッカロースなど)、遊離アミノ酸とそれらの誘導体 (タウリン及びβアラニンなど)、及びメチルアミン (例えば、トリメチルアミンN酸化物 (TMAO)、ベタイン、及びサルコシン) あるいはメチルアミンと尿素との組み合わせである (Yancey et al., "Living with water stress: evolution of osmolyte systems" Science 217 (1982), 1214-1222 参照のこと)。

【0009】 本発明の主要な効果の一つとして、浸透物質をかかると溶液に加えるだけで、多種にわたる非活性表面に対する前記物質の相互作用を適当に低減または阻害することができる。よって、特定の実験設定または実験目的を得るために必要な表面を特別に設計もしくは選択する必要がない。本発明によるさらなる効果として、以前は困難であった様々な実験の設計を単純化できるため、関心のある研究者にとっては時間とコストの節減になる。

#### 【0010】

【発明の実施の形態】 本明細書において用いられる「生物分子」という用語は、有機体または生物細胞 (living

cell) の一部である有機分子、またはかかる分子の誘導体を意味する。これらの分子の起源は、天然でも合成でも半合成でもよい。

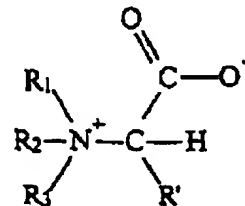
【0011】 また、ここで用いられる「非活性 (inert)」という用語は、「化学的反応能力を全くまたはわずかに持たない」という意味である。したがって、この用語は、大気中において結合されない状態で発生する窒素に関する「不活性の性質 (inertness)」と同義である。

10 【0012】 本発明による使用法の好適な実施形態において、前記浸透物質は、両性イオン浸透物質である。

【0013】 本発明の使用法にかかる非常に好適な実施形態では、前記両性イオン浸透物質は、以下の構造式 (structural formula) を有する。

#### 【0014】

#### 【化2】



20 なお、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>およびR<sub>3</sub>はH (水素)、CH<sub>3</sub>、C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>、またはその他任意のアルキルであり、R' は任意のアミノ酸残基である。

【0015】 本発明の使用法にかかるさらに好適な実施形態では、前記両性イオン浸透物質は、アミノ酸またはそのメチル化産物である。

30 【0016】 本発明の使用法にかかるさらに別の好適な実施形態では、前記両性イオン浸透物質は、ベタイン及び好ましくはグリシンベタインである。

【0017】 本発明のさらに好適な実施形態においては、前記浸透物質は、1~2.5 Mの最終濃度で存在する。

【0018】 前記浸透物質の効果的な特性は、この物質が1 M以下の濃度で反応混合物に含まれる場合に得られるが、浸透物質が1~2.5 Mの最終濃度で存在する場合に、特に効果的な結果が得られる。

40 【0019】 本発明のさらに好適な実施形態においては、前記生物分子は、巨大分子 (macromolecule) である。

【0020】 「生物分子」に関する「巨大分子」という用語は、当該分野の技術者には明らかであり、ここで詳細な説明は必要でない。

50 【0021】 本発明の使用にかかる好適な実施形態においては、前記巨大分子は、炭水化物、多核酸またはポリペプチド、またはそれらの混合物または修飾物である。前記混合物または修飾物は必ずしも生物学的な機能を持つ必要はない。実際には、その生物学的機能については (現在のところ) 当該技術分野では知られていない (例

えば、ペプチド核酸についての議論 (Nielsen et al. Science 254 (1991), 1497-1500) を参照のこと)。しかしながら、前記修正された生物学的巨大分子は、誘導源である生物学的巨大分子と本質的に同一の物理化学的特性を有し、例えば分子生物学において同一または同様に適用できる可能性がある。

【0022】本発明のさらに好適な実施形態においては、前記生物分子は、ペプチドまたはオリゴヌクレオチドまたはこれらの混合物または修飾物である。

【0023】本発明の好適な実施形態においては、前記多核酸またはオリゴヌクレオチドはDNAである。

【0024】ここで用いられる「DNA」という用語は、いかなるタイプのDNA、特にcDNA及びゲノムDNAを含む。

【0025】本発明のさらに好適な実施形態においては、前記多核酸またはオリゴヌクレオチドは、RNAである。

【0026】本発明において用いられる「RNA」という用語は、いかなるタイプのRNAを含めることができるが、特にmRNAを意味する。

【0027】本発明の別の好適な実施形態においては、前記非活性表面はシリコン表面、シリコンウェーハ、ガラス表面、またはこれらの混合物または化学的修飾物である。

【0028】最も便宜的には、前記物質は製造されたシリコンであり、かかるシリコンは、例えば、フォトリソグラフィなどの標準的な製造または処理技術によって得ることができる。

【0029】本発明は、さらに、(a) 前記のように規定された浸透物質の濃縮保存溶液と、(b) 前記のように規定された浸透物質を含む反応緩衝調整剤と、(c) 前記のように規定された浸透物質を含む酵素調整剤と、の少なくともいずれか一つを含むキットに関する。

【0030】本発明によるキットの様々な成分は、好ましくは標準的な反応ガラス瓶 (reaction vials) 中で調整され、互いに独立している。本発明のキットに含まれる保存溶液に使用される濃度は、本発明において効果を発揮するよう浸透物質を適当に希釈するのに適した濃度である。本発明の緩衝剤の実施形態 (b) 及び (c) においては、浸透物質は好ましくは最終的な濃度で含まれている。前記最終濃度の範囲及び限定は、上述の通りである。

#### 【0031】

##### 【実施例】

【実施例1】シリコン粒子及び両性イオン浸透物質の存在下でのポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)

本実施例では、核酸鋳型に依存したPCR反応における純粋なシリコン表面等の非活性表面による阻害効果がベタインなどの浸透物質の存在により低減されることを示す。なお、本実施例では、Sigma社から市販されて

いるグリシンベタインを用いた。

【0032】シリコンは、半導体技術において非常に重要な材料であるばかりでなく、生物分野においても重要である。これはこの物質の取り扱いが容易であり、また、三次元の微小構造を迅速に形成することができることに由来する。そのため、PCRを初めとして、純粋なシリコンの存在下における種々の実験は、例えば、シリコン懸濁液を用いた生物学的プロセスの小型化モデルの確立という観点から、将来大変重要となる。純粋なシリコンは、種々の原因より一般にPCRのような生物学的プロセスを阻害することが知られている。これらの原因の一つとして、例えば、微少な反応チャンパ内の極小さな容積に比して、かなり大きな表面と分子とが相互作用を行うことが考えられる。

【0033】PCRにおける純粋なシリコン表面の阻害効果を試験するために、モデルシステムとして、破砕したシリコン粒子の存在下、M13ベクターに挿入された1.2kbのヒト染色体DNAをPCRにより増幅する実験を行った。

【0034】反応を行うに当たり、水 (図1、レーン2から5) または1Mベタイン溶液 (図1、レーン6から9) に懸濁された種々の量 (10、50、75) のシリコン粒子、0.2μM以下配列を有する2種のプライマー、100μM各dNTP、1.5mM MgCl<sub>2</sub>及び2.5ユニットTaqポリメラーゼを含有した1倍濃度の緩衝液 (10mM Tris-HCl, pH8.8及び50mM KCl) に、1ngのM13DNAを懸濁し、最終容量を50μlとしたものを準備した。上記2種のプライマーの配列は、M13-40 (24塩基) が、5'-CGCCAGGGTTTCCAGTCACGAC-3'であり、また、M13-Rev (24塩基) が、5'-TTTCACACAGAAACAGCTATGAC-3'である。また、上記においてベタインを含有する反応液の場合には、必要な水と5Mベタインの保存溶液とを混合し最終反応容量の50μlに調整した。

【0035】なお、ここで用いたシリコン粒子は、約0.5mm x 0.5mm x 0.3mmのものをを用いた。

【0036】上記混合液を調整後、以下の条件下でPCRを行った。PCRの条件は、94℃、20秒間 (変性)、55℃、30秒間 (アニーリング)、73℃、2分30秒間 (伸長) とし、これを30サイクル繰り返した。反応後、5μlの反応液に2μlの電気泳動溶液 (70%グリセロール、0.02mg/mlプロモフェノールブルー) を混合し、アガロースゲル上で電気泳動を行った。尚、この際にサイズマーカーとしてλ-BstEIIを前記ゲル上に同時に泳動した。

【0037】電気泳動の結果を図1に示す。なお、図1の各レーンには、以下のサンプルを泳動した。レーン1: λ-BstEIIマーカー; レーン2から5: 水及び

種々の量のシリコン粒子を用いてバッファ中で行ったPCR (50  $\mu$ l) ; レーン2 : 10粒子 ; レーン3 : 50粒子 ; レーン4 : 75粒子 ; レーン5 : 対照粒子ゼロ ; レーン6から9 : 1Mのベタイン及び種々の量のシリコン粒子を用いてバッファ中で行ったPCR (50  $\mu$ l) ; レーン6 : 10粒子 ; レーン7 : 50粒子 ; レーン8 : 75粒子 ; レーン9 : 対照粒子ゼロ。

【0038】図1に示す通り、シリコン粒子の添加量の増加による阻害効果が、PCRバッファ中に添加された種々のモル濃度のベタインにおいて示された。

【0039】〔実施例2〕シリコン粉末及び両性イオン浸透物質の存在下でのPCRに対する影響

上述したShoffnerらにより、近年、PCR反応へのシリコン粉末の阻害効果が示されている。本実施例は、PCRの反応バッファ中に浸透物質、例えば両性イオン浸透物質であるベタインを添加することにより、上記阻害効果を効果的に低減させることができることを示す。

【0040】PCR実験は、モデルシステムとして、ヒト染色体DNA由来の1.5 kb断片が挿入されたM13ベクターを用いて行った。シリコンを含有するPCR反応液は、4.6 mgシリコン粉末 (Sigma社、325メッシュ、純度99%、製品番号21561-9) を最終容量として100  $\mu$ lに調整した。ここで純粋なシリコン粉末の濃度は、前記Shoffnerらにより示されたPCR反応を阻害する濃度とした。

【0041】PCRを行うに当たり、以下の反応液を調整した。すなわち、1倍濃度の緩衝液 (10 mM Tris-HCl, pH 8.8及び50 mM KCl)、水 (図2、レーン2) あるいは4.6 mgシリコン粉末を含有する溶液 (図2、レーン3から8)、1 ng M13 DNA、0.3  $\mu$ M M13-40プライマーDNA (24塩基、5' -CGCCAGGGTTTCCAGTCACGAC-3')、0.3  $\mu$ M M13-RevプライマーDNA (24塩基、5' -TTTCACACAGGAAACAGCTATGAC-3')、200  $\mu$ M各dNTP、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>及び10ユニットTaqポリメラーゼを、最終容量として100  $\mu$ lに調整したものを準備した。前記4.6 mgシリコン粉末を含有する溶液は、水 (図2、レーン3)、0.5 Mベタイン溶液 (図2、レーン4)、1 M

\*ベタイン溶液 (図2、レーン5)、2 Mベタイン溶液 (図2、レーン6) を用いて調整した。また、上記においてベタインを含有する反応液の場合には、必要な量の水と5 Mベタインの保存溶液とを混合して最終容量の100  $\mu$ lに調整した。

【0042】上記混合液調整後、以下の条件下でPCR反応を行った。すなわち、PCRの条件は、94℃、20秒間 (変性)、55℃、30秒間 (アニーリング)、73℃、2分30秒間 (伸長) とし、これを30サイクル繰り返した。反応後、5  $\mu$ lの反応液に2  $\mu$ lの電気泳動溶液 (70%グリセロール、0.02 mg/mlプロモフェノールブルー) を混合し、アガロースゲル上で電気泳動を行った。尚、この際にサイズマーカーとして $\lambda$ -BstEIIを前記ゲル上に同時に泳動した。

【0043】泳動結果を図2に示す。なお、図2における各レーンには、以下のサンプルを泳動した。レーン1 :  $\lambda$ -BstEIIマーカー ; レーン2 : シリコン粉末を包含しない標準的なPCRバッファ中で行ったPCR ; レーン3から6 : 100  $\mu$ lのPCR量において4.6 mgのシリコン粉末を用いて行ったPCR反応 ; レーン3 : 水をベースにしたバッファ ; レーン4 ; 0.5 Mベタイン溶液 ; レーン5 : 1 ベタイン溶液 ; レーン6 ; 2 Mベタイン溶液。

【0044】図2に示す通り、モル濃度のベタインを用いたPCRは、PCRを効果的かつ特定の増幅し、シリコン表面の阻害効果を低減させることができることが示された。

【0045】

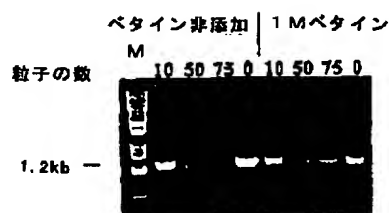
【発明の効果】以上の通り、本発明の浸透物質を用いることにより、非活性表面に対する生物分子の非共有結合による相互作用を削減または破壊することができる。この結果、種々の生物学的実験の効率を向上させることが可能となる。

【図面の簡単な説明】

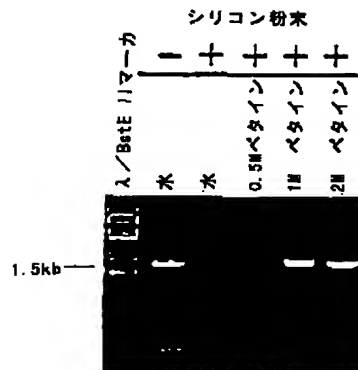
【図1】 シリコン粒子及び両性イオン浸透物質の存在下におけるPCR産物を電気泳動した際のパターンを示す図である。

【図2】 シリコン粉末及び両性イオン浸透物質の存在下におけるPCR産物を電気泳動した際のパターンを示す図である。

【図1】



【図2】



## 【手続補正書】

【提出日】平成9年9月18日

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正内容】

【書類名】明細書

【発明の名称】浸透物質の使用

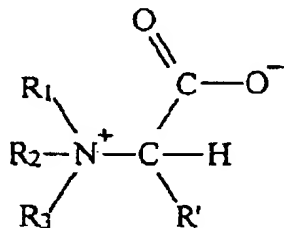
【特許請求の範囲】

【請求項1】 非活性表面に対する生物分子の非共有結合による相互作用を削減または破壊するための浸透物質の使用。

【請求項2】 前記浸透物質が両性イオン浸透物質である請求項1に記載の浸透物質の使用。

【請求項3】 前記両性イオン浸透物質が以下の構造からなる請求項2に記載の浸透物質の使用。

【化1】



R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>およびR<sub>3</sub>はH（水素）、CH<sub>3</sub>、C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>またはその他任意のアルキルであり、R' は任意のアミノ酸残基である。

【請求項4】 前記両性イオン浸透物質がアミノ酸またはアミノ酸のメチル化産物である請求項3に記載の浸透物質の使用。

【請求項5】 前記両性イオン浸透物質がグリシンベタインまたはその他のベタインである請求項3に記載の浸

透物質の使用。

【請求項6】 前記浸透物質が最終濃度として1から2.5Mの濃度で存在する請求項1～5のいずれかに記載の浸透物質の使用。

【請求項7】 前記生物分子が巨大分子である請求項1～6のいずれかに記載の浸透物質の使用。

【請求項8】 巨大分子が炭水化物、ポリ核酸、ポリペプチド、これらの組み合わせ、またはこれらの修飾物である請求項1～6のいずれかに記載の浸透物質の使用。

【請求項9】 生物分子がペプチド、オリゴヌクレオチド、これらの組み合わせ、またはこれらの修飾物質である請求項1～6のいずれかに記載の浸透物質の使用。

【請求項10】 前記ポリ核酸及び前記オリゴヌクレオチドがDNAである請求項8又は9に記載の浸透物質の使用。

【請求項11】 前記ポリ核酸及び前記オリゴヌクレオチドがRNAである請求項8又は9に記載の浸透物質の使用。

【請求項12】 非活性表面がシリコン表面、シリコンウェーハ、ガラス表面、これらの組み合わせまたはこれらの化学修飾物である請求項1～11のいずれかに記載の浸透物質の使用。

【請求項13】 上記請求項1～12のいずれかに記載された浸透物質の濃縮保存溶液と、上記請求項1～12のいずれかに記載された浸透物質を含有する反応緩衝液調整物質と、上記請求項1～12のいずれかに記載された浸透物質を含有した酵素調整物質と、を少なくとも含むキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、非活性表面に対する生物分子の非共有結合相互作用（non-covalent interactions）を低減または阻害するための浸透物質の使用法

に関する。さらに、本発明は、本発明による使用法に用いることのできるキットに関する。

#### 【0002】

【従来の技術】新物質の開発は、現代技術の幅広い分野において大きな影響を与えている。例えば、過去の例としては、シリコン、ガリウム亜ヒ酸塩、または多結晶物質などの導入は半導体技術に根強く浸透した。現代生物学においても、同様の開発が認められている。すなわち、過去20年にわたり、ELISAなどの免疫計量 (immunometric) 法において、実験プロトコルの基準化及び実験結果における物質に基づく誤差率の最小化を実現する物質が確立された。また、これと同様に重要な別の開発としては、対象となる生物学的化合物を純化及び分離するために (カラム) クロマトグラフィーにおいて用いられる新規の担体物質の促進がある。

【0003】多くの生物学的な分析及び分離技術において科学者が直面する主な問題の一つとして、実験の精度及び生産収量が、背景問題または望ましくない可能性のある不特定相互作用の問題によって損なわれるという問題がある。かかる問題は、例えば、担体表面に対するタンパク質または他の生物学的な化合物の非共有結合により発生しうる。ELISA技術においてかかる問題を解決するためには、問題の化合物をテストする前に、ポリスチロール (polystyrol) などの担体物質の自由結合サイトを異種構造タンパク質などの関連のない生物物質に対して「遮断」する。

【0004】最も最近において革命的な分子生物学の技術は、PCR技術である。当然ながら、PCRの幅広い適用性に鑑み、この技術の様々な側面をさらに改良すべく多大な努力が現在までも、また現在でも行われている。これらの開発の一つとして、微少化されたPCRチップ、すなわち、PCR反応チャンバを形成するために平坦なガラス片に結合された微少化生成シリコンチップの開発がある (例えば、Shoffner et al., "Chip PCR. I. Surface passivation of microfabricated silicon-glass chips for PCR", Nucl. Acids Res. 24(1996), 375-379参照のこと)。これまでPCRチップの製造に用いられてきた天然シリコンがPCRの阻害剤であることが判明した。そのために研究者たちはかかる阻害剤または背景問題によって損なわれることのない信頼できるPCRの結果を得るための物質及び方法を調査し、その結果、この目標達成のために酸化シリコン ( $\text{SiO}_2$ ) の使用を提案した。

【0005】このような功績を認めた上で、さらに、一般的に商業上の利用が可能な表面を修正せずに、あるいは適当な非活性表面のわずかな部分の使用のみに限定することなく、非活性表面と生物分子の不特定あるいは非共有相互作用を低減または削除する方法があれば、非常に望ましく効果的である。このような手段の開発が成功すれば、その使用はPCR技術に限定されることなく現

代生物学において幅広く適用できる。例えば、Volkmuth及びAustinにより、DNA分子のmicro-electrophoresis (微量電気泳動法) が開発された (Volkmuth and Austin, "DNA electrophoresis in micro lithographic arrays", Nature 358(1992), 600-602参照のこと)。このような技術は、ペタインなどの浸透物質を緩衝システムに含むという点からも効果がある。

#### 【0006】

【発明が解決しようとする課題】このように、本発明の技術的課題は、上述の従来技術に関する問題を解決し、非活性表面に対する生物分子の望ましくない相互作用を低減または阻害するシステムを開発することである。

#### 【0007】

【課題を解決するための手段】上記目的を達成するため、本発明は、非活性表面に対する生物分子の非共有相互作用を低減または阻害するための浸透物質の使用法を提供する。本発明によれば、適当な濃度の浸透物質を、生物分子を含む溶液に加えることにより、前記表面に対する前記分子の非共有結合相互作用が阻害されないまでも低減されるという驚くべき効果が得られる。

【0008】浸透物質 (または浸透溶質) は、水による応力を与えられた (water-stressed) 多種の原核生物及び真核生物有機体から得られる。ハロバクテリアを除くこれらすべての有機体において見られる浸透物質システムの3つの種類は、多価アルコール (グリセロール及びサッカロースなど)、遊離アミノ酸とそれらの誘導体 (タウリン及びβアラニンなど)、及びメチルアミン (例えば、トリメチルアミンN酸化物 (TMAO)、ペタイン、及びサルコシン) あるいはメチルアミンと尿素との組み合わせである (Yancey et al., "Living with water stress: evolution of osmolyte systems" Science 217 (1982), 1214-1222 参照のこと)。

【0009】本発明の主要な効果の一つとして、浸透物質をかかると溶液に加えるだけで、多種にわたる非活性表面に対する前記物質の相互作用を適当に低減または阻害することができる。よって、特定の実験設定または実験目的を得るために必要な表面を特別に設計もしくは選択する必要がない。本発明によるさらなる効果として、以前は困難であった様々な実験の設計を単純化できるため、関心のある研究者にとっては時間とコストの節減になる。

#### 【0010】

【発明の実施の形態】本明細書において用いられる「生物分子」という用語は、有機体または生物細胞 (living cell) の一部である有機分子、またはかかる分子の誘導体を意味する。これらの分子の起源は、天然でも合成でも半合成でもよい。

【0011】また、ここで用いられる「非活性 (inert)」という用語は、「化学的反応能力を全くまたはわずかに持たない」という意味である。したがって、こ

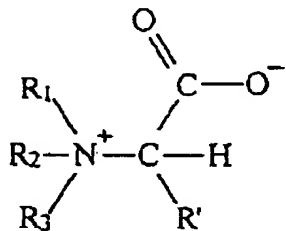
の用語は、大気中において結合されない状態で発生する窒素に関する「不活性の性質 (inertness)」と同義である。

【0012】本発明による使用法の好適な実施形態において、前記浸透物質は、両性イオン浸透物質である。

【0013】本発明の使用法にかかる非常に好適な実施形態では、前記両性イオン浸透物質は、以下の構造式 (structural formula) を有する。

【0014】

【化2】



なお、 $\text{R}_1$ 、 $\text{R}_2$ および $\text{R}_3$ はH (水素)、 $\text{CH}_3$ 、 $\text{C}_2\text{H}_5$ またはその他任意のアルキルであり、 $\text{R}'$ は任意のアミノ酸残基である。

【0015】本発明の使用法にかかるさらに好適な実施形態では、前記両性イオン浸透物質は、アミノ酸またはそのメチル化産物である。

【0016】本発明の使用法にかかるさらに別の好適な実施形態では、前記両性イオン浸透物質は、ベタイン及び好ましくはグリシンベタインである。

【0017】本発明のさらに好適な実施形態においては、前記浸透物質は、1～2.5Mの最終濃度で存在する。

【0018】前記浸透物質の効果的な特性は、この物質が1M以下の濃度で反応混合物に含まれる場合に得られるが、浸透物質が1～2.5Mの最終濃度で存在する場合に、特に効果的な結果が得られる。

【0019】本発明のさらに好適な実施形態においては、前記生物分子は、巨大分子 (macromolecule) である。

【0020】「生物分子」に関する「巨大分子」という用語は、当該分野の技術者には明らかであり、ここで詳細な説明は必要でない。

【0021】本発明の使用にかかる好適な実施形態においては、前記巨大分子は、炭水化物、多核酸またはポリペプチド、またはそれらの混合物または修飾物である。前記混合物または修飾物は必ずしも生物学的な機能を持つ必要はない。実際には、その生物学的機能については (現在のところ) 当該技術分野では知られていない (例えば、ペプチド核酸についての議論 (Nielsen et al. Science 254 (1991), 1497-1500) を参照のこと)。しかしながら、前記修正された生物学的巨大分子は、誘導源である生物学的巨大分子と本質的に同一の物理化学的特

性を有し、例えば分子生物学において同一または同様に適用できる可能性がある。

【0022】本発明のさらに好適な実施形態においては、前記生物分子は、ペプチドまたはオリゴヌクレオチドまたはこれらの混合物または修飾物である。

【0023】本発明の好適な実施形態においては、前記多核酸またはオリゴヌクレオチドはDNAである。

【0024】ここで用いられる「DNA」という用語は、いかなるタイプのDNA、特にcDNA及びゲノムDNAを含む。

【0025】本発明のさらに好適な実施形態においては、前記多核酸またはオリゴヌクレオチドは、RNAである。

【0026】本発明において用いられる「RNA」という用語は、いかなるタイプのRNAを含めることができるが、特にmRNAを意味する。

【0027】本発明の別の好適な実施形態においては、前記非活性表面はシリコン表面、シリコンウェーハ、ガラス表面、またはこれらの混合物または化学的修飾物である。

【0028】最も便宜的には、前記物質は製造されたシリコンであり、かかるシリコンは、例えば、フォトリソグラフィなどの標準的な製造または処理技術によって得ることができる。

【0029】本発明は、さらに、(a) 前記のように規定された浸透物質の濃縮保存溶液と、(b) 前記のように規定された浸透物質を含む反応緩衝調整剤と、(c) 前記のように規定された浸透物質を含む酵素調整剤と、の少なくともいずれか一つを含むキットに関する。

【0030】本発明によるキットの様々な成分は、好ましくは標準的な反応ガラス瓶 (reaction vials) 中で調整され、互いに独立している。本発明のキットに含まれる保存溶液に使用される濃度は、本発明において効果を発揮するよう浸透物質を適当に希釈するのに適した濃度である。本発明の緩衝剤の実施形態 (b) 及び (c) においては、浸透物質は好ましくは最終的な濃度で包含されている。前記最終濃度の範囲及び限定は、上述の通りである。

【0031】

【実施例】

【実施例1】シリコン粒子及び両性イオン浸透物質の存在下でのポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 本実施例では、核酸鋳型に依存したPCR反応における純粋なシリコン表面等の非活性表面による阻害効果がベタインなどの浸透物質の存在により低減されることを示す。なお、本実施例では、Sigma社から市販されているグリシンベタインを用いた。

【0032】シリコンは、半導体技術において非常に重要な材料であるばかりでなく、生物分野においても重要である。これはこの物質の取り扱いが容易であり、ま



た、三次元の微小構造を迅速に形成することができることに由来する。そのため、PCRを初めとして、純粋なシリコンの存在下における種々の実験は、例えば、シリコン懸濁液を用いた生物学的プロセスの小型化モデルの確立という観点から、将来大変重要となる。純粋なシリコンは、種々の原因より一般にPCRのような生物学的プロセスを阻害することが知られている。これらの原因の一つとして、例えば、微少な反応チャンバ内の極小さな容積に比して、かなり大きな表面と分子とが相互作用を行うことが考えられる。

【0033】PCRにおける純粋なシリコン表面の阻害効果を試験するために、モデルシステムとして、破碎したシリコン粒子の存在下、M13ベクターに挿入された1.2 kbのヒト染色体DNAをPCRにより増幅する実験を行った。

【0034】反応を行うに当たり、水(図1、レーン2から5)または1Mベタイン溶液(図1、レーン6から9)に懸濁された種々の量(10、50、75)のシリコン粒子、0.2 μM以下配列を有する2種のプライマー、100 μM各dNTP、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>及び2.5ユニットTaqポリメラーゼを含有した1倍濃度の緩衝液(10 mM Tris-HCl, pH 8.8及び50 mM KCl)に、1 ngのM13 DNAを懸濁し、最終容量を50 μlとしたものを準備した。上記2種のプライマーの配列は、M13-40(24塩基)が、5'-CGCCAGGGTTTCCAGTCACGAC-3'(配列番号1)であり、また、M13-Rev(24塩基)が、5'-TTTCACACAGGAACAGCTATGAC-3'(配列番号2)である。また、上記においてベタインを含有する反応液の場合には、必要な量の水と5Mベタインの保存溶液とを混合し最終反応容量の50 μlに調整した。

【0035】なお、ここで用いたシリコン粒子は、約0.5 mm x 0.5 mm x 0.3 mmのものをを用いた。

【0036】上記混合液を調整後、以下の条件下でPCRを行った。PCRの条件は、94℃、20秒間(変性)、55℃、30秒間(アニーリング)、73℃、2分30秒間(伸長)とし、これを30サイクル繰り返した。反応後、5 μlの反応液に2 μlの電気泳動溶液(70%グリセロール、0.02 mg/mlプロモフェノールブルー)を混合し、アガロースゲル上で電気泳動を行った。尚、この際にサイズマーカーとしてλ-BstEIIを前記ゲル上に同時に泳動した。

【0037】電気泳動の結果を図1に示す。なお、図1の各レーンには、以下のサンプルを泳動した。レーン1: λ-BstEIIマーカー; レーン2から5: 水及び種々の量のシリコン粒子を用いてバッファ中で行ったPCR(50 μl); レーン2: 10粒子; レーン3: 50粒子; レーン4: 75粒子; レーン5: 対照粒子ゼロ; レーン6から9: 1Mのベタイン及び種々の量のシ

リコン粒子を用いてバッファ中で行ったPCR(50 μl); レーン6: 10粒子; レーン7: 50粒子; レーン8: 75粒子; レーン9: 対照粒子ゼロ。

【0038】図1に示す通り、シリコン粒子の添加量の増加による阻害効果が、PCRバッファ中に添加された種々のモル濃度のベタインにおいて示された。

【0039】[実施例2]シリコン粉末及び両性イオン浸透物質の存在下でのPCRに対する影響  
上述したShoffnerらにより、近年、PCR反応へのシリコン粉末の阻害効果が示されている。本実施例は、PCRの反応バッファ中に浸透物質、例えば両性イオン浸透物質であるベタインを添加することにより、上記阻害効果を効果的に低減させることができることを示す。

【0040】PCR実験は、モデルシステムとして、ヒト染色体DNA由来の1.5 kb断片が挿入されたM13ベクターを用いて行った。シリコンを含有するPCR反応液は、4.6 mgシリコン粉末(Sigma社、325メッシュ、純度99%、製品番号21561-9)を最終容量として100 μlに調整した。ここで純粋なシリコン粉末の濃度は、前記Shoffnerらにより示されたPCR反応を阻害する濃度とした。

【0041】PCRを行うに当たり、以下の反応液を調整した。すなわち、1倍濃度の緩衝液(10 mM Tris-HCl, pH 8.8及び50 mM KCl)、水(図2、レーン2)あるいは4.6 mgシリコン粉末を含有する溶液(図2、レーン3から8)、1 ng M13 DNA、0.3 μM M13-40プライマーDNA(24塩基、5'-CGCCAGGGTTTCCAGTCACGAC-3'(配列番号1))、0.3 μM M13-RevプライマーDNA(24塩基、5'-TTTCACACAGGAACAGCTATGAC-3'(配列番号2))、200 μM各dNTP、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>及び10ユニットTaqポリメラーゼを、最終容量として100 μlに調整したものを準備した。前記4.6 mgシリコン粉末を含有する溶液は、水(図2、レーン3)、0.5 Mベタイン溶液(図2、レーン4)、1 Mベタイン溶液(図2、レーン5)、2 Mベタイン溶液(図2、レーン6)を用いて調整した。また、上記においてベタインを含有する反応液の場合には、必要な量の水と5Mベタインの保存溶液とを混合して最終容量の100 μlに調整した。

【0042】上記混合液調整後、以下の条件下でPCR反応を行った。すなわち、PCRの条件は、94℃、20秒間(変性)、55℃、30秒間(アニーリング)、73℃、2分30秒間(伸長)とし、これを30サイクル繰り返した。反応後、5 μlの反応液に2 μlの電気泳動溶液(70%グリセロール、0.02 mg/mlプロモフェノールブルー)を混合し、アガロースゲル上で電気泳動を行った。尚、この際にサイズマーカーとしてλ-BstEIIを前記ゲル上に同時に泳動した。

【0043】泳動結果を図2に示す。なお、図2における各レーンには、以下のサンプルを泳動した。レーン1： $\lambda$ -BstEIIマーカ；レーン2：シリコン粉末を包含しない標準的なPCRバッファ中で行ったPCR；レーン3から6：100 $\mu$ lのPCR量において4.6mgのシリコン粉末を用いて行ったPCR反応；レーン3：水をベースにしたバッファ；レーン4；0.5Mベタイン溶液；レーン5：1ベタイン溶液；レーン6；2Mベタイン溶液。

【0044】図2に示す通り、モル濃度のベタインを用いたPCRは、PCRを効果的かつ特定の増幅し、シリコン表面の阻害効果を低減させることができることが示された。

【0045】

配列：

CGCCAGGGTT TTCCAGTCA CGAC

配列番号：2

配列の長さ：24

配列の型：核酸

配列：

TTTCACACAG GAAACAGCTA TGAC

【図面の簡単な説明】

【図1】 シリコン粒子及び両性イオン浸透物質の存在下におけるPCR産物を電気泳動した際のパターンを示す図である。

【発明の効果】以上の通り、本発明の浸透物質を用いることにより、非活性表面に対する生物分子の非共有結合による相互作用を削減または破壊することができる。この結果、種々の生物学的実験の効率を向上させることが可能となる。

【0046】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：24

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

24

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

24

【図2】 シリコン粉末及び両性イオン浸透物質の存在下におけるPCR産物を電気泳動した際のパターンを示す図である。